

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-015400

(43)Date of publication of application : 26.01.1993

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68  
C12N 15/10  
C12Q 1/04  
//(C12Q 1/04  
C12R 1:225 )

(21)Application number : 03-191114

(71)Applicant : SAPPORO BREWERIES LTD

(22)Date of filing : 05.07.1991

(72)Inventor : TSUCHIYA YOICHI  
KANEDA HIROTAKA  
KANO YUKINOBU

## (54) OLIGONUCLEOTIDE AND DETECTION OF LACTIC BACTERIA USING THE SAME

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To provide an oligonucleotide for selectively detecting lactic bacteria in a specimen, or for detecting such lactic bacteria as to have adverse effects on beer quality, complementary to the sequence, as target, coding the 5SrRNA gene in the lactic bacteria. **CONSTITUTION:** The objective oligonucleotide can be obtained by chemical synthesis of (A) an oligonucleotide for selectively detecting lactic bacteria found in a specimen [e.g. *Lactobacillus brevis* (JCM 1059 T)] or (B) another kind of oligonucleotide having (1) at least one of sequences of respective formulas I and II so as to be complementary to the nucleotide sequence, as target, coding the 5SrRNA gene in the lactic bacteria or (2) complementary sequence corresponding to this (these) sequence(s). The present oligonucleotide is functioned as the primer for chain lengthening reaction to selectively amplifying the target nucleotide sequence followed by determining the presence or absence of the sequence to be recognized in a specimen, thus detecting the lactic bacteria.

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 02.06.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3067850

[Date of registration] 19.05.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right] 19.05.2003

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-15400

(43)公開日 平成5年(1993)1月26日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
C 12 Q 1/68  
C 12 N 15/10  
C 12 Q 1/04  
// (C 12 Q 1/04  
C 12 R 1:225)

識別記号 ZNA A 8114-4B  
ZNA 6807-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 6(全 5 頁)

(21)出願番号 特願平3-191114

(22)出願日 平成3年(1991)7月5日

(71)出願人 000002196

サツボロビール株式会社

東京都中央区銀座7丁目10番1号

(72)発明者 土屋 陽一

静岡県焼津市岡当目10 サツボロビール株式会社醸造技術研究所内

(72)発明者 金田 弘拳

静岡県焼津市岡当目10 サツボロビール株式会社醸造技術研究所内

(72)発明者 狩野 幸信

静岡県焼津市岡当目10 サツボロビール株式会社醸造技術研究所内

(74)代理人 弁理士 久保田 藤郎

(54)【発明の名称】 オリゴヌクレオチド及びそれを用いた乳酸菌の検出法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 ビールの品質に悪影響を及ぼす L. b. r e v i s をはじめとする乳酸菌の検出法を提供する。

【構成】 検体中に存在する乳酸菌を選択的に検出するためのオリゴヌクレオチドまたは乳酸菌の5S rRNA 遺伝

5' - T G T G G T G G C G A T A G C C T G A A - 3' . . . (a)

5' - G C G T G G C A A C G T C C T A T C C T - 3' . . . (b)

の少なくとも1つを有するか、または該配列に対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド並びに上記の配列群のうち、少なくとも1つを有するオリゴヌクレオチドを鎖長反応のプライマーとして機能

子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列と相補的となるように化学合成されたオリゴヌクレオチドであって、該ヌクレオチドが以下の配列群

させ、標的ヌクレオチド配列を選択的に增幅させた後、検体内に認識されるべき配列が存在しているか否かを判定することにより乳酸菌の検出を行うことを特徴とする乳酸菌の検出方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 検体中に存在する乳酸菌を選択的に検出するためのオリゴヌクレオチドまたは乳酸菌の5S rRNA 遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、その

5' - T G T G G T G G C G A T A G C C T G A A - 3' . . . (a)  
5' - G C G T G G C A A C G T C C T A T C C T - 3' . . . (b)

の少なくとも1つを有するか、または該配列に対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項2】 オリゴヌクレオチドが、請求項1に記載された各オリゴヌクレオチドの配列のうち、少なくとも連続した10塩基以上を含むものであるオリゴヌクレオチド。

【請求項3】 請求項1に記載された配列群のうち、少なくとも1つを有するオリゴヌクレオチドを鎖長反応のプライマーとして機能させ、標的ヌクレオチド配列を選択的に増幅させた後、検体内に認識されるべき配列が存在しているか否かを判定することにより乳酸菌の検出を行うことを特徴とする乳酸菌の検出方法。

【請求項4】 請求項3記載の方法における反応物から電気泳動又はクロマトグラフィーにより、増幅されたヌクレオチドを分離し、該ヌクレオチドの分子量を決定することにより乳酸菌の検出を行う請求項3記載の方法。

【請求項5】 請求項3記載の方法における反応物を用い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はアガロース電気泳動及び臭化エチジウムによる核酸染色を行うことにより乳酸菌の検出を行う請求項3記載の方法。

【請求項6】 請求項1記載の配列群のうち、少なくとも1つを有するオリゴヌクレオチドをプローブとして機能させ、膜上あるいはその他支持体上の標的ヌクレオチド配列を選択的に検出する請求項3記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、オリゴヌクレオチド及びそれを用いた乳酸菌の検出法に関し、詳しくは食品、特にビールの品質に悪影響を及ぼすL.brevisをはじめとする乳酸菌の検出法に関するものである。

5' - T G T G G T G G C G A T A G C C T G A A - 3' . . . (a)  
5' - G C G T G G C A A C G T C C T A T C C T - 3' . . . (b)

の少なくとも1つを有するか、または該配列に対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド並びに上記配列群のうち、少なくとも1つを有するオリゴヌクレオチドを鎖長反応のプライマーとして機能させ、標的ヌクレオチド配列を選択的に増幅させた後、検体内に認識されるべき配列が存在しているか否かを判定することにより乳酸菌の検出を行うことを特徴とする乳酸菌の検出方法を提供するものである。

【0005】 本発明は、乳酸菌、特にラクトバチルス・ブレビスの5S rRNA 遺伝子と選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを作製し、このオリゴヌクレオチ

ヌクレオチド配列と相補的となるように化学合成されたオリゴヌクレオチドであって、該ヌクレオチドが以下の配列群

5' - T G T G G T G G C G A T A G C C T G A A - 3' . . . (a)  
5' - G C G T G G C A A C G T C C T A T C C T - 3' . . . (b)

## 【0002】

【從来の技術と発明が解決しようとする課題】 食品、特にビール製造において乳酸菌[ ラクトバチルス (Lactobacillus) 属またはペディオコッカス (Pediacoccus) 属 ] はその耐酸性と耐アルコール性から最も重要な有害菌であり、その高感度かつ迅速な検出法が待望されてきた。しかしながら、從来の培養法による乳酸菌の検出には数日を要し、抗体による方法は選択性には優れているが、検出感度が劣る。また、菌体内ATPを抽出し、ルシフェラーゼルシフェリンを用いて蛍光分析を行う方法は乳酸菌の検出感度に優れるけれども選択性に劣る。さらに、最近オリゴヌクレオチドを用いたDNAプローブ法あるいはハイブリダイゼーション法が試みられるようになってきたが、これらの方針も十分な検出感度と選択性を得るのが難しい。このように、從来より種々の方法が開発されてはいるものの、いずれも一長一短があり、検出感度、選択性ともに優れた乳酸菌の検出方法は未だ存在しないのが現状である。

【0003】 そこで、本発明の目的は、オリゴヌクレオチドを核酸合成反応のプライマーとして機能させた遺伝子増幅技術により乳酸菌、特にラクトバチルス・ブレビス (L.brevis) 由来の5S rRNA 遺伝子を検出する方法に關し、食品の微生物管理検査に有用な、乳酸菌の簡便、迅速かつ高感度な検出法を提供することにある。

## 【0004】

【課題を解決するための手段および作用】 本発明は、検体中に存在する乳酸菌を選択的に検出するためのオリゴヌクレオチドまたは乳酸菌の5S rRNA 遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列と相補的となるように化学合成されたオリゴヌクレオチドであって、該ヌクレオチドが以下の配列群

5' - T G T G G T G G C G A T A G C C T G A A - 3' . . . (a)  
5' - G C G T G G C A A C G T C C T A T C C T - 3' . . . (b)

ドをプライマーとして遺伝子増幅に用い、乳酸菌を選択的に検出することを特徴としている。

【0006】 本発明において、遺伝子増幅は例えばSaikiaらが開発したPolymerase Chain Reaction 法 (Science 230, 1350 (1985)、以下、PCR法と略すことがある。) に基づいて行うことができる。この方法は、ある特定のヌクレオチド配列領域（本発明の場合はラクトバチルス・ブレビスの5S rRNA 遺伝子）を検出する場合、その領域の両端の一方は+鎖を、他方は-鎖をそれぞれ認識してハイブリダイゼーションするようなオリゴヌクレオチドを用意し、それを熱変性により1本鎖状態にし

た試料核酸に対して鑄型依存性ヌクレオチド重合反応のプライマーとして機能させ、生成した2本鎖核酸を再び1本鎖に分離したのち、再び同様な反応を起こせるものである。この一連の操作を繰り返すことにより、2つのプライマーに挟まれた領域は検出できるまでにコピー

5' - T G T G G T G G G C G A T A G C C T G A A - 3' . . . (a)

5' - G C G T G G C A A C G T C C T A T C C T - 3' . . . (b)

の少なくとも1つを有するか、または該配列に対応する相補的配列を有するものである。このオリゴヌクレオチドは化学合成で得られるものあるいは天然のもののどちらでも良い。また、プライマーは特に検出用として標識されていなくても良い。

【0008】プライマーが規定している増幅領域は、50塩基から2000塩基、望ましくは100塩基から1000塩基となれば良い。鑄型依存性ヌクレオチド重合反応には、耐熱性DNAポリメラーゼを用いるが、この酵素の起源については90～95℃の温度で活性を有していれば、どの生物種由来であっても良い。熱変性温度は90～95℃、プライマーをハイブリダイズさせるアニーリング操作は37～65℃、好ましくは40～60℃、重合反応は50～75℃、好ましくは70～75℃であり、これを1サイクルとして20から40サイクル行って増幅させる。

【0009】乳酸菌の検出は、酵素反応液をそのままポリアクリルアミドゲル電気泳動又はアガロースゲル電気泳動にかけることによって行われ、増幅されたヌクレオチド断片の存在及びその長さが確認できる。その結果から、検体中にプライマーが認識すべき配列を持ったヌクレオチドが存在しているかどうかを判定することができる。この判定は、そのまま乳酸菌の有無を判定するものとなる。増幅されたヌクレオチド断片の検出には、他の電気泳動やクロマトグラフィーも有効である。

#### 【0010】

5' - T G T G G T G G G C G A T A G C C T G A A - 3' . . . (a)

5' - G C G T G G C A A C G T C C T A T C C T - 3' . . . (b)

#### 【0012】PCR法

10 x 反応用バッファー、dNTP溶液及び耐熱性DNAポリメラーゼはGene-Amp kits(Perkin Elmer Cetus社製)を使用し、同説明書通りの量を用いた。反応条件は以下の通りである。

熱変性: 94℃, 1分

アニーリング: 50℃, 2分

重合反応: 72℃, 1.5分

熱変性からアニーリングを経て重合反応にいたる過程を1サイクルとし、これを35サイクル行った。

#### 【0013】乳酸菌の検出

反応液から増幅されたヌクレオチド断片を検出する方法として、縦型の8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲルサイズ80x80mm)を行った。PCR処理後の反応液から10μlを取り出し、電気泳動を行った。

数が増大していく。

【0007】本発明でプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドは、選択性や検出感度および再現性から考えて10塩基以上、望ましくは15塩基以上の長さを持ったヌクレオチド断片で、以下の配列群

5' - T G T G G T G G G C G A T A G C C T G A A - 3' . . . (a)

5' - G C G T G G C A A C G T C C T A T C C T - 3' . . . (b)

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

#### 10 実施例1

##### 検体の調製

ラクトバチルス・ブレビス (JCM1059<sup>T</sup>) の培養液100μlについてコロニーカウントによる菌数測定を行う一方、同濃度の菌体培養液100μlに150μlの溶菌液A [(1.67M sucrose/0.67% 2-mercaptoethanol/0.33 mg/ml zymolyase/0.33 mg/ml lysozyme/0.67 μg/ml mutanolysin) in 16.7 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)] を添加し、37℃で60分処理した後、150μlの溶菌液B [(13.3mM MgCl<sub>2</sub>/2.7% Triton X-100/2.7% diethyl pyrocarbonate/0.27 mg/ml proteinase K/6.7% SDS) in 10 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)] を添加し、70℃で10分処理して溶菌を行った。この後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱処理を行って核酸成分を精製し、10μlの緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0)/1mM EDTA)に溶かし、これを検体とした。

#### 【0011】プライマーの合成

ラクトバチルス・ブレビス (JCM1059<sup>T</sup>) 5S rRNA遺伝子の配列(Woese, C.R. et al. J. Mol. Evol. 8, 143-153(1976)) から下記の配列を選び、それと同じ配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成した。なお、DNA合成および精製は宝酒造株式会社に委託した。

5' - T G T G G T G G G C G A T A G C C T G A A - 3' . . . (a)

5' - G C G T G G C A A C G T C C T A T C C T - 3' . . . (b)

なお、電気泳動はTBE溶液(89mM Tris/89mM boric acid/2mM EDTA(pH 8.0))を用い、43V/cmで12分行った。その後、ゲルを臭化エチジウム溶液(0.5 μg/ml)にて染色し、紫外線照射によって視覚化した。反応液の他に分子量マーカーの泳動も同時にを行い、相対移動度の比較により、ヌクレオチドの長さを算出した。

#### 【0014】結果

前述したように、ラクトバチルス・ブレビスの5S rRNA遺伝子は既に塩基配列が明らかにされており、本発明のオリゴヌクレオチド、すなわちプライマーがPCR法により増幅されてくるヌクレオチドの長さは推定できる。それによると、プライマー(a)と(b)では、117塩基対(bp)の長さのヌクレオチドが増幅されてくる筈である。図1に示したものは、様々な濃度のラクトバチルス・ブレビスを本法によって検出したものである。同

図からわかるように、増幅されたヌクレオチドの長さは推定された通りであり、プライマー (a) と (b) が 5 S rRNA 遺伝子の標的としている領域を正しく増幅してきていることを示している。さらに、100 μl のサンプル中にわずか 1 菌体 (cell) でも存在すれば、検出可能であることがわかる。

#### 【0015】実施例2

本法を実際の工場の現場等で用いることを考えた場合、まず食品から菌体を捕獲し、検体の量を 100 μl にまでスケールダウンする必要がある。そこで、以下の検討を行った。

#### 方法

250 ml のビールに様々な数のラクトバチルス・ブレビスを加え、デュラポア親水性メンブレンフィルター（直径 47 mm、孔径 0.22 μm、Millipore 社製）で吸引濾過した後、フィルターを 10 ml 容器のチューブに入れ 5 ml のエタノールを添加した。30 分振とうした後、フィルターを取り除き、チューブ内のエタノールを濃縮乾固した。しかし後、100 μl の滅菌水に溶かした。これを菌体懸濁液として実施例 1 に記載した方法でラクトバチルス・ブレビスの検出を行った。その結果を図 2 に示す。

#### 【0016】結果

図から明らかなように、図 1 の場合と同様に、117 bp

の長さのヌクレオチドの増幅がみられ、250 ml のビール中にわずか 30 菌体存在すれば、検出できることがわかる。なお、実施例 1 に比べて検出感度が落ちる原因としては、菌体がフィルター内に留まって完全には洗い出されないことが最大の原因であると考えられる。何故ならば、ビールによる濾過操作を省いて、菌体とフィルターをそれぞれ 10 ml 容チューブに入れた場合には、検出感度の低下はほとんどないからである。

#### 【0017】実施例3

実施例 1 及び実施例 2 で得られた結果が乳酸菌に対し選択性のものかどうかを確かめるため、乳酸菌及び他の食品一般細菌、そして酵母について比較検討した。方法は、実施例 1 に示したものと同じであるが、各菌体の濃度は 100 μl のサンプル当たり 10<sup>4</sup> cells 以上となるようにした。結果を表 1 に示す。表 1 において、117 bp の長さのヌクレオチドの増幅がみられたものは+、増幅がみられなかったものは-と表示した。ラクトバチルス・ブレビスをはじめ乳酸菌については 117 bp の長さのヌクレオチドの増幅が認められるが、その他の微生物については増幅が認められないことから乳酸菌を容易に区別し、選択性的に検出できることがわかった。

#### 【0018】

#### 【表1】

表 1

菌株名	117 bp の増幅
<i>Lactobacillus brevis</i> JCM 1059 <sup>T</sup>	+
<i>Lactobacillus pastorianus</i> JCM 1113	+
<i>Lactobacillus casei</i> JCM 1163	+
<i>Pediococcus damnosus</i> JCM 5886 <sup>T</sup>	+
<i>Corynebacterium facians</i> IAM 1079	-
<i>Microbacterium flavum</i> IAM 1642	-
<i>Sarcina lutea</i> IFO 3232	-
<i>Streptococcus lactis</i> IFO 12007	-
<i>Pseudomonas fragi</i> IAM 1650	-
<i>Escherichia coli</i> JM109	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W34	-

#### 【0019】

【発明の効果】本発明では遺伝子の増幅を行うにあたり、PCR 法を用いているため、乳酸菌の検出において遺伝子増幅による高い検出感度と、2つあるいはそれ以上のプライマーで反応が規定されることによる高い選択性を得ることができる。また、高い検出感度のため多量の検体を必要とせず、しかも検体の前処理が簡便で済む。その上、本発明によれば、反応時間が短く、検出も簡単な機材だけで行うことができ、操作も容易なため、同定までの時間を大幅に短縮できる。例えば実施例の場

合、PCR 反応時間が約 5 時間、検出にかかる時間が約 40 分である。また、乳酸菌の検出にポリアクリルアミドゲル電気泳動又はアガロースゲル電気泳動と臭化エチジウムによる核酸染色法を用いることで、プライマー等に標識せずに検出を行うことができる。しかも、核酸の長さが確認できるので、結果の信頼性が高いものとなる。

#### 【0020】

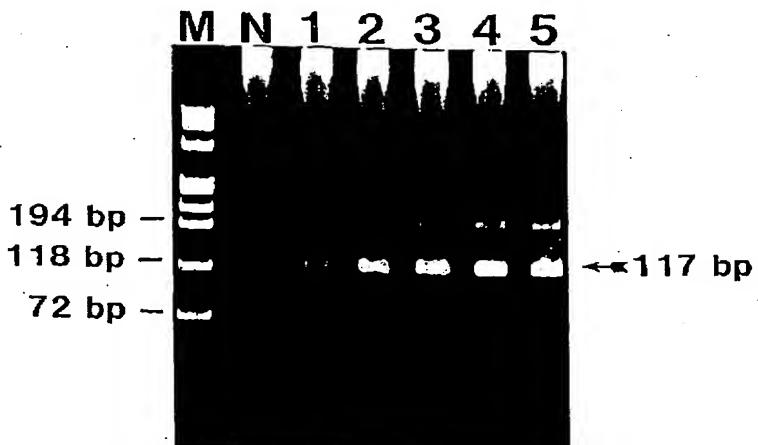
#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例 1 のポリアクリルアミドゲル電気泳動

の結果を示しており、図中のレーンはMがDNAサイズマーカー ( $\phi$ X174/HaeIII, digest)、Nがネガティブコントロール(菌数0)、1がラクトバチルス・ブレビスの菌数1個、2が同菌数8個、3が同菌数50個、4が同菌数 $10^3$ 個、5が同菌数 $10^4$ 個を示す。

【図2】 実施例2のポリアクリラミドゲル電気泳動

【図1】



【図2】

